ÜBER DIE OXYDATION DES ARBUTINS MIT DER KARTOFFEL - PHENOLOXYDASE

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Freien Universität Berlin

überreicht von

Kurt Dolling

aus Berlin

1962

Druck:

Ernst - Reuter - Gesellschaft
der Förderer und Freunde der Freien Universität e.V.

Dissertations - Druckstelle

Berlin-Dahlem, Garystr. 45, Tel.: 76 52 81, App. 668

ÜBER DIE OXYDATION DES ARBUTINS MIT DER KARTOFFEL - PHENOLOXYDASE

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Freien Universität Berlin

überreicht von

Kurt Dolling

aus Berlin

1962

1. Berichterstatter: Prof. Dr. G. SCHENCK

2. Berichterstatter: Prof. Dr. N. KREUTZKAMP

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

Tag der mündlichen Prüfung: 5.11.1962

Tag der Promotion: 19. Dez. 1962

Die vorliegende Arbeit wurde am Pharmazeutischen Institut der Freien Universität Berlin durchgeführt.

Herrn Professor Dr. G. SCHENCK danke ich aufrichtig für die Überlassung des Themas und für sein Interesse, das er meiner Arbeit und meiner wissenschaftlichen Weiterbildung entgegenbrachte.

Herrn Priv.Doz.Dr. K.H.FRÖMMING möchte ich für die stets freundliche Unterstützung und für die wertvollen Ratschläge zur praktischen Durchführung der Arbeit meinen Dank aussprechen.

Inhaltsverzeichnis

		Seite
A	Einleitung und Problemstellung	5
B	Experimenteller Teil	7
	1. Die Fermentgewinnung und ihre Aktivitätsbestimmung	7
	2. Die Oxydation von Arbutin mit Phenoloxydase	9
	3. Der Einfluß von Ascorbinsäure auf die Arbutin-Oxydation	12
	4. Beeinflussung der Arbutin-Oxydation durch natürliche phenolische Begleitstoffe	12
	a) Beeinflussung der fermentativen Arbutin-Oxydation durch Chlorogensäure und Isochlorogensäure	14
	b) Beeinflussung der fermentativen Arbutin-Oxydation durch d-Catechin und l-Epicatechin	17
	c) Beeinflussung der fermentativen Arbutin-Oxydation durch Gallussäure	20
	5. Der Einfluß von Emulsin auf die Arbutin-Oxydation	22
	6. Die Einwirkung der Phenoloxydase auf Emulsin und Glukose	27
	7. In vitro-Untersuchungen in dem System Ferment/Arbutin/Hydrochinon	28
	a) Der Einfluß der Fermentkonzentration	28
	b) Der Einfluß der Arbutinkonzentration	28
	c) Der Einfluß der Hydrochinonkonzentration	31

Seite

d) Einfluß des Zeitpunktes der Hydrochinon-zugabe 33

e) Einfluß des Ausmaßes der fermentativen Arbutinspaltung 36

C Zusammenfassung 40

D Literaturverzeichnis 42

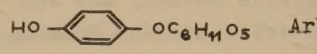
A: Einleitung und Problemstellung

Arbutin ist einer der wesentlichen Inhaltsstoffe von Bärentraubenblättern (Arctostaphylos uva ursi) (1) und Birnenblättern (Pirus communis) (2). Bisher wurde angenommen, daß die therapeutische Anwendung der Bärentraubenblätter auf dem Vorkommen dieses Glykosids beruht, aus dem durch den Abbau im Harn das die bakteriostatische Wirkung hervorrufende Hydrochinon abgespalten werden soll. Diese langjährige Ansicht wird jedoch in einer neueren Arbeit von SCHÜTZ angezweifelt, nach der weder Arbutin noch Hydrochinon eine bakteriostatische Wirkung auf harnspezifische Krankheitserreger ausüben (27).

Bei der Gewinnung des Arbutins aus Bärentraubenblättern, d.h. zunächst bei der Ernte und Trocknung der Droge, muß man bemüht sein, unerwünschte Veränderungen der Inhaltsstoffe zu vermeiden. Es sind schonende Aufbereitungsverfahren anzuwenden, um die Glykoside nicht zu zerstören; die anschließende Trocknung muß rasch vor sich gehen,damit fermentative Spaltungen vermieden werden. Diese Veränderungen werden hauptsächlich von glykosidspaltenden Enzymen, den Glykosidasen, bewirkt, die eine Spaltung der Glykoside zu meist therapeutisch wertlosen Aglykonen und Zuckerresten hervorrufen (1;2).

Als weitere für den Pharmazeuten interessante Fermente enthalten die genannten Pflanzen Oxydations-Enzyme, von denen besonders die Phenoloxydase erwähnt werden soll. Dieses Enzym ist ein im Pflanzenreich weitverbreitetes Ferment, das unter bestimmten strukturellen Voraussetzungen Monophenole, o-Diphenole und Polyphenole oxydieren kann(3;4;5). Bekannte natürlich vorkommende Substrate sind z.B. Kaffeesäure, Chlorogensäure, Gallussäure und Catechine, die in erster Reaktionsstufe zu den entsprechenden Chinonen oxydiert werden (6).

Die in den Blättern von Pirus-Arten, insbesondere Pirus communis, selbst bei schonendster Trocknung (Infrarot-Trocknung) auftretende Schwarzfärbung kann wenigstens zum Teil auf die Wirkung dieses Enzyms zurückzuführen sein. Gleichzeitig findet hierbei eine Verminderung des Arbutingehaltes auf etwa die Hälfte statt (7); daher fanden Birnenblätter keine Aufnahme in den Arzneischatz.



Arbutin

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte nun, unabhängig von den zur Diskussion stehenden verschiedenen pharmakologischen Ansichten, untersucht werden, inwieweit die Phenoloxydase Arbutin oxydieren und demzufolge für eine Abnahme des Glykosidgehaltes in der Pflanze mitverantwortlich sein kann. Rein theoretisch ist eine Oxydation des Arbutins als monophenolische Verbindung möglich, da rein strukturell die wesentlichen Vorbedingungen hierfür erfüllt sind (4); diese liegen vor allem darin, daß beide ortho-Stellungen zur Hydroxyl-Gruppe nicht substituiert sind.

Im weiteren sollte die Einwirkung anderer natürlich in Bärentrauben- und Birnenblättern vorkommender phenolischer Begleitstoffe auf das System Phenoloxydase/Arbutin untersucht werden, durch die häufig eine beachtliche Beeinflussung der Aktivität der Phenoloxydase eintreten kann (4). Solche Stoffe sind z.B. in Bärentraubenblättern Hydrochinon und Flavone; während Birnenblätter Chlorogensäure, Isochlorogensäure, d-Catechin, l-Epicatechin, Gallussäure, Hydrochinon und Flavonyl-Glykoside enthalten (8).

B: Experimenteller Teil

1. Die Fermentgewinnung und ihre Aktivitätsbestimmung

Als Ausgangsmaterial zur Fermentgewinnung diente die Kartoffelsorte "Ackersegen". Die Herstellung der Phenoloxydase-Präparation erfolgte im wesentlichen nach der Vorschrift von KUBOWITZ bis zur zweiten Fraktionierung mit Ammonsulfat und anschließender zweieinhalbtägiger Dialyse (9,10). Die Herstellung des Fermentes geschah bei einer Temperatur von 2-4°C, um Aktivitätsverluste zu vermeiden. Um katalytisch wirkende Metallteile fernzuhalten, wurden bei der Herstellung Metallgeräte nicht benutzt.

Das Volumen der erhaltenen klaren Fermentlösung betrug 410 ml, gewonnen aus 20 kg Kartoffeln. Die Lösung wurde dann gefriergetrocknet*), wobei 2,4 g einer trocknen, gelblich-weißen Präparation hinterblieben, die bei 0°C aufbewahrt wurden. Vor den Versuchen wurde die jeweils erforderliche Menge in bidestilliertem Wasser aufgelöst. Durch die Gefriertrocknung wird die Haltbarkeit des Fermentes wesentlich gesteigert.

Die Aktivitätsbestimmungen und die Messungen des Sauerstoffverbrauches der einzelnen Substrate wurden in der WARBURG-Apparatur durchgeführt (11). Für sämtliche Untersuchungen wurde Zitronensäure-Phosphatpuffer nach MC ILVAINE benutzt (12). Alle Versuche wurden bei 25°C durchgeführt.

Der Hauptraum der WARBURG-Gefäße enthielt die Pufferlösung und die Lösung der Substrate, die seitlichen Ansatzbirnen enthielten das Ferment. Vor der Zugabe des Fermentes zur Reaktionslösung wurde bei offenen Manometern ein zehnminütiger Temperaturausgleich durchgeführt.

*) Für die Gefriertrocknung des Fermentes bin ich der Firma SCHERING AG zu besonderem Dank verpflichtet.

Zur Berücksichtigung von Druckdifferenzen liefen bei allen Versuchen zwei Gefäße mit, die anstelle des Fermentes bidestilliertes Wasser in den Ansatzbirnen enthielten. Die hierbei ermittelten Werte wurden bei der Auswertung der Meßergebnisse berücksichtigt.

Die Aktivität des Fermentes wurde mit p-Kresol bestimmt und hieraus die Cresolase-Einheiten errechnet. Die Reaktionsansätze enthielten:

2,0ml Wasser mit 9,0mg p-Kresol
2,0ml Puffer pH 6,0
1 0ml Fermentverdünnung 1+49; 25°C.

Zur Herstellung der Fermentlösung wurden 6,0mg des Trockenpräparates in 1,0ml bidestilliertem Wasser gelöst, und die Lösung mit 49,0ml bidestilliertem Wasser verdünnt. Nach GRAUBARD und NELSON versteht man unter einer Cresolase-Einheit die Aktivität einer Fermentmenge, die bei pH 6,0 und 25°C auf 9,0mg p-Kresol pro 5,0ml Reaktionsflüssigkeit einwirkt, und hierbei eine Sauerstoffaufnahme von 10 µl pro Minute während der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit bewirkt (13). Die Fermentpräparation hatte eine Aktivität von 48 Cresolase-Einheiten pro ml.

Das für die Untersuchungen verwendete Arbutin "MERCK" erwies sich als papierchromatographisch rein. (Fließmittel: Butanol/Eisessig/Wasser, 4+1+5; Sprühmittel: diazotierte Sulfanilsäure in Natriumkarbonat-Lösung 10%; bzw. Phosphormolybdänsäure/methanolische Kalilauge).

Der Schmelzpunkt lag bei 194°C, geprüft mit der KOFLER-Schmelzpunktapparatur. (Fp Lit. 194°C).

2. Die Oxydation von Arbutin mit Phenoloxydase

Um zu untersuchen, ob überhaupt eine fermentative Oxydation des Arbutins eintrat, wurde auf 6,0mg Arbutin in 5,0ml Reaktionslösung bei pH 7,0 eine Fermentverdünnung 1+9 in den Reaktionsgefäßen der WARBURG-Apparatur einwirken gelassen und 180 Minuten bei 25°C geschüttelt. Nach 40 Minuten trat Sauerstoffverbrauch auf, der bis zu einer maximalen Geschwindigkeit zunahm; die Reaktionslösung nahm eine dunkelbraune Färbung an, während ein Blindversuch, der anstelle des Fermentes Wasser enthielt, keinen Sauerstoffverbrauch und keine Farbänderung ergab. Nach 180 Minuten war die Reaktion nahezu beendet (Abb. 1).

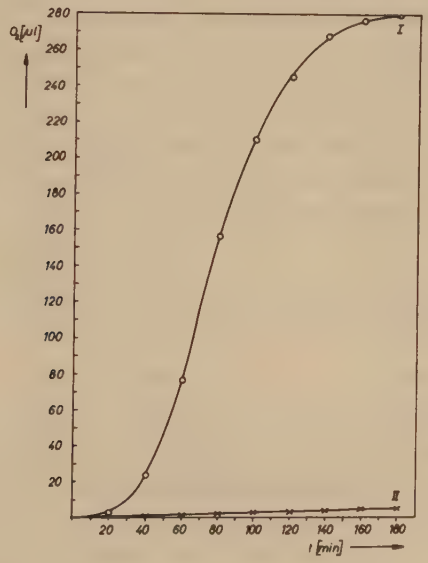


Abb. 1: Oxydation des Arbutins mit Phenoloxydase
Reaktionsansatz:
I : 1,0ml Wasser mit 6,0mg Arbutin; 3,0ml Puffer pH 7,0 bzw.
II : pH 6,0; 1,0ml Ferment 1+9; 25° .

Arbutin zeigte also bei der Oxydation eine sog. Induktionsperiode, die für Monophenole bei der Oxydation mit Phenoloxydase charakteristisch ist (3;5).
Eine Autoxydation des Arbutins trat unter den gegebenen Bedingungen nicht ein.
Zum Vergleich wurde derselbe Versuch bei pH 6,0 durchgeführt; hierbei trat innerhalb von 180 Minuten nur ein geringer Sauerstoffverbrauch auf. Die Lösung war nach der angegebenen Zeit nur schwach gelb gefärbt.
Um zu überprüfen, inwieweit eine stärkere Oxydation des Arbutins bei pH 6,0 möglich ist, wurde die Versuchsdauer auf 350 Minuten ausgedehnt und die Fermentkonzentration erhöht (Abb.2).

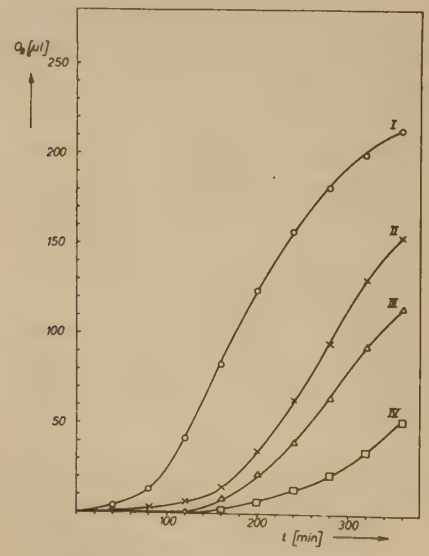
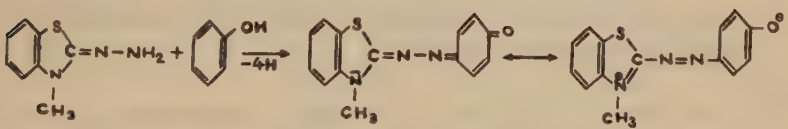


Abb.2: Oxydation des Arbutins mit Phenoloxydase bei pH 6,0
Reaktionsansatz:
0,5ml Wasser mit 3,0mg Arbutin; 1,5ml Puffer pH 6,0; 0,5ml Ferment 1+1 (I) bzw. 1+2 (II) bzw. 1+4 (III) bzw. 1+8 (IV); 25°.

Hierbei war die Induktionsperiode so groß, daß erst bei längerer Fermenteinwirkung die Oxydation begann. Sie verlief erwartungsgemäß bei der Fermentkonzentration 1+1 am stärksten und fiel mit fallenden Fermentkonzentrationen ab. Es konnte weiterhin beobachtet werden, daß bei der Fermentverdünnung 1+1 die Induktionszeit am kleinsten ist.

Eine Ausscheidung von Kohlendioxyd war bei der Einwirkung der Phenoloxydase auf Arbutin theoretisch nicht zu erwarten und konnte auch nicht festgestellt werden. Diese Untersuchungen wurden ebenfalls manometrisch durchgeführt, wobei die Einsätze im Hauptraum der WARBURG-Gefäße mit 0,2ml Natronlauge (10%) und Filtrierpapier zur Vergrösserung der Oberfläche versehen wurden.

Zur weiteren Untersuchung, ob eine fermentative Oxydation vorlag, diente die Kupplung des fermentativ gebildeten chinoiden Oxydationsproduktes mit BESTHORN's Hydrazon (Hydrazon des N-Methyl-benzthiazolons) (14). Nach KASTNER ist diese Kondensation geeignet, eine fermentative Oxydation von phenolischen Verbindungen auch in geringen Konzentrationen festzustellen (15). Bei der Kupplung mit Phenol verläuft die Reaktion analog der Indanilin-Synthese nach folgender Gleichung (16;17):



Zum Nachweis wurden im Reagenzglas 5,0mg Arbutin in 4,3ml Puffer von pH 6,0 gelöst und dazu 0,2ml einer methanolischen Lösung von 3,5mg BESTHORN's Hydrazon sowie 0,5ml Fermentverdünnung 1+19 gegeben. Innerhalb von fünf Minuten trat Rotfärbung der Lösung ein, die mit Chloroform oder Butanol ausgeschüttelt werden konnte. KASTNER hatte darauf hingewiesen, daß die Farbentwicklung bei der fermentativen Oxydation von Monophenolen wegen der Induktionsperiode langsamer erfolgt als bei der Oxydation von Diphenolen (15).

3. Der Einfluß von Ascorbinsäure auf die Arbutin-Oxydation

Auch die Versuche mit Ascorbinsäure bewiesen eindeutig eine Oxydation des Arbutins durch das Ferment. Ascorbinsäure wird von Phenoloxydase allein nicht angegriffen. Verschiedene Autoren fanden jedoch, daß bei Verwendung von phenolischen Substanzen wie Rutin, Brenzkatechin, Kaffeesäure, Chlorogensäure, Catechine oder auch fermentativ oxydierbarer monophenolischer Verbindungen durch Vermittlung der primär gebildeten Chinone eine Oxydation der Ascorbinsäure zu Dehydroascorbinsäure erfolgt (9;10; 18;19;). Die Chinone werden hierbei zu den entsprechenden Diphenolen wieder reduziert wie z.B. das Rutinchinon zum Rutin und das p-Benzochinon zum Hydrochinon (9;18). Auf Grund dieser Beobachtungen müßte theoretisch bei einer fermentativen Oxydation des Arbutins das primär gebildete Arbutin-Oxydationsprodukt als Überträger auf die Ascorbinsäure wirken und diese oxydieren, was durch erhöhten Sauerstoffverbrauch gegenüber Arbutin angezeigt werden würde. Diese Erwartungen traten ein; die Oxydation setzte in dem Gemisch sofort sehr stark ein, wobei die Induktionszeit des Arbutins aufgehoben wurde (Abb.3).

4. Beeinflussung der Arbutin-Oxydation durch natürliche phenolische Begleitstoffe

Als gemeinsam mit Arbutin in der Natur vorkommende phenolische Stoffe kommen, wie in der Einleitung schon erwähnt, Chlorogensäure, Isochlorogensäure, d-Catechin, l-Epicatechin, Gallussäure, Hydrochinon und Flavonylglykoside in Betracht. Mit Ausnahme des Hydrochinons und der Flavonylglykoside können diese phenolischen Substanzen von der Phenoloxydase oxydiert werden. Die Induktionszeit entfällt, da es sich um Diphenole handelt. Die Gallussäure als Triphenol wird wesentlich langsamer oxydiert als die genannten Diphenole (4;5).

Es sollte nun untersucht werden, ob bei Anwesenheit dieser Verbindungen charakteristische Änderungen der fermentativen Arbutin-Oxydation eintreten.

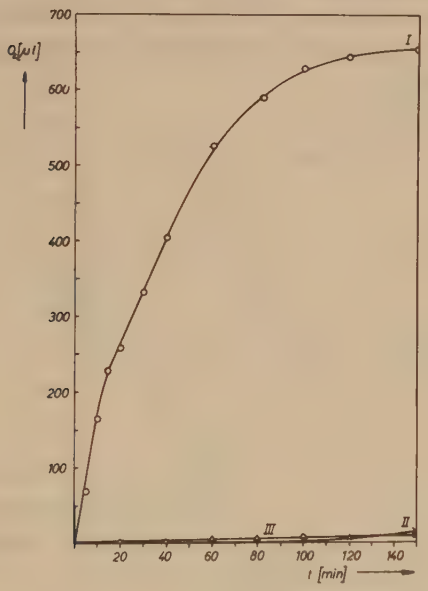


Abb. 3: Oxydation des Arbutins in Gegenwart von Ascorbinsäure
Reaktionsansatz:
I: 1,0ml Wasser mit 5,0mg Arbutin; 3,0ml Puffer pH 6,0 mit 2,0mg Ascorbinsäure; 1,0ml Ferment 1+2; 25°.
II: 5,0mg Arbutin
III: 2,0mg Ascorbinsäure.

a) Beeinflussung der fermentativen Arbutin-Oxydation durch Chlorogensäure und Isochlorogensäure

Bei Zusatz relativ kleiner Konzentrationen an Chlorogensäure zu einem fermentativ zu oxydierenden Arbutin-Ansatz bei pH 7,0 konnte gezeigt werden, daß die Induktionszeit wegfällt und innerhalb von 150 Minuten mehr Sauerstoff verbraucht wird, als bei der Oxydation der entsprechenden Arbutin-Menge (Abb.4).

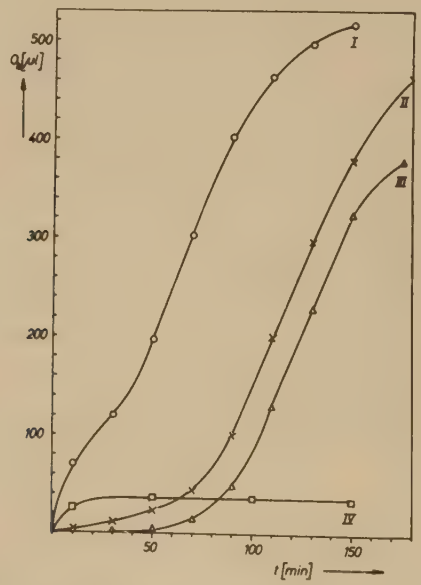


Abb. 4: Fermentative Arbutin-Oxydation in Gegenwart von Chlorogensäure

Reaktionsansatz:

I: 1,0ml Wasser mit 10,0mg Arbutin; 3,0ml Puffer pH 7,0 mit 1000 γ Chlorogensäure bzw.

II: 100 γ Chlorogensäure; 1,0ml Ferment 1+9; 25°.

III: 10,0mg Arbutin

IV: 1000 γ Chlorogensäure.

Ähnliche Beobachtungen konnten bei Verwendung wesentlich verdünnterer Fermentkonzentrationen (1+99) gemacht werden, von denen Arbutin allein nicht mehr manometrisch meßbar oxydiert wurde (Abb. 5).

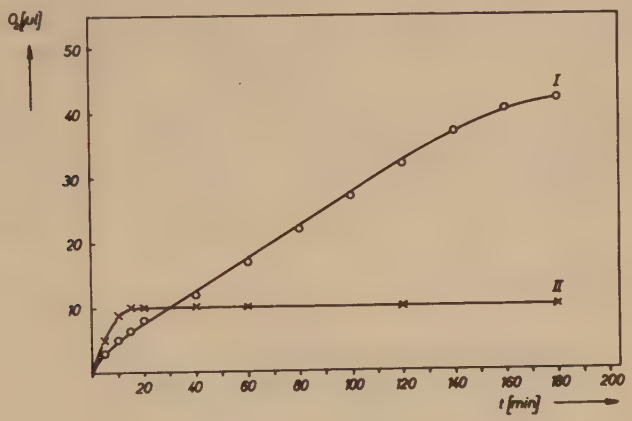


Abb. 5: Fermentative Arbutin-Oxydation in Gegenwart von Chlorogensäure
Reaktionsansatz:
I: 1,0ml Wasser mit 10,0mg Arbutin; 3,0ml Puffer pH 7,0 mit 100γ Chlorogensäure; 1,0ml Ferment 1+99; 25°.
II: 100γ Chlorogensäure

10,0mg Arbutin zeigten keinen manometrisch meßbaren Sauerstoffverbrauch.

Auch bei Verwendung von Isochlorogensäure, die sich von der Chlorogensäure in der isomeren depsidischen Verknüpfung der Kaffeesäure und Chinasäure unterscheidet, (in der Chlorogensäure ist das Hydroxyl 3 der Chinasäure, in der Isochlorogensäure das Hydroxyl 5 der Chinasäure durch Kaffeesäure verestert) (20), konnte eine ähnliche Wirkung erwartet werden. Dies wurde durch das Experiment bestätigt.

Es zeigte sich, daß während der Meßdauer die Chlorogensäure die Arbutin-Oxydation etwas stärker beschleunigte als die Isochlorogensäure, was sich in einem verstärkten Sauerstoffverbrauch bemerkbar machte (Abb. 6).

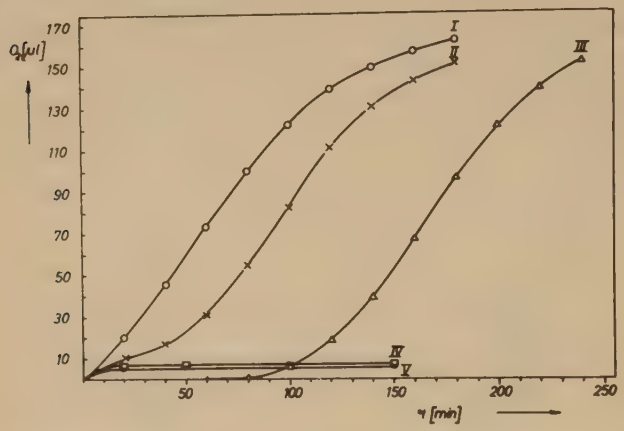


Abb.6: Fermentative Arbutin-Oxydation in Gegenwart von Chlorogensäure und Isochlorogensäure
Reaktionsansatz:

I. 1,0ml Wasser mit 6,0mg Arbutin; 3,0ml Puffer pH 6,6 mit 300 γ Chlorogensäure bzw.
II: 300 γ Isochlorogensäure; 1,0ml Ferment 1+19;25°.
III: 6,0mg Arbutin
IV: 300 γ Chlorogensäure
V: 300 γ Isochlorogensäure.

Wahrscheinlich wird bei diesen Reaktionen durch das sehr schnell fermentativ gebildete Chlorogensäure-Chinon bzw. Isochlorogensäure-Chinon nichtfermentativ erheblich mehr Arbutin oxydiert als bei der fermentativen Oxydation des Arbutins. Deshalb nennen wir solche Stoffe, wie Chlorogen-

säure oder Isochlorogensäure, auch Ü b e r t r ä g e r . Es wurde festgestellt, daß der Sauerstoffverbrauch in der Zeiteinheit von der Konzentration dieser Überträgerstoffe und der Konzentration des Fermentes abhängig ist; d.h. je mehr Überträgerstoffe hinzugesetzt werden und je stärker die Fermentkonzentration ist, umso kürzer ist die Induktionszeit und damit umso größer auch der Sauerstoffverbrauch bei Beginn der Oxydation.
Bei Zugaben von 10 γ Chlorogensäure bzw. Isochlorogensäure zum Arbutin-Ansatz konnte in der WARBURG-Apparatur noch kein Sauerstoff-Mehrverbrauch gegenüber der Oxydation des Arbutins allein festgestellt werden.

b) Beeinflussung der fermentativen Arbutin-Oxydation durch d-Catechin und l-Epicatechin

Die fermentative Oxydation von d-Catechin und l-Epicatechin wurde von LINDE eingehend untersucht (21). Er stellte fest, daß unter gleichen Versuchsbedingungen l-Epicatechin schneller oxydiert wird und mehr Sauerstoff verbraucht als d-Catechin.

Es konnte daher erwartet werden, daß im System Ferment / l-Epicatechin / Arbutin mehr Sauerstoff verbraucht wird als im entsprechenden Ansatz Ferment/d-Catechin/Arbutin. Diese Erwartung wurde bestätigt. Bei Zusatz kleinerer Mengen Überträger konnte zunächst, verbunden mit einer Verkürzung der Induktionszeit, eine Verstärkung der Arbutin - Oxydation festgestellt werden. Bei Gegenwart größerer Mengen Überträger wurden jedoch Hemmerscheinungen festgestellt. Bei Verwendung von 150 γ bzw. 300 γ Überträger wurde nach etwa 90 Minuten die Reaktionsgeschwindigkeit, ausgedrückt durch den Sauerstoffverbrauch in der Zeiteinheit, in den Gemischen geringer als bei der Oxydation von Arbutin allein (Abb. 7).

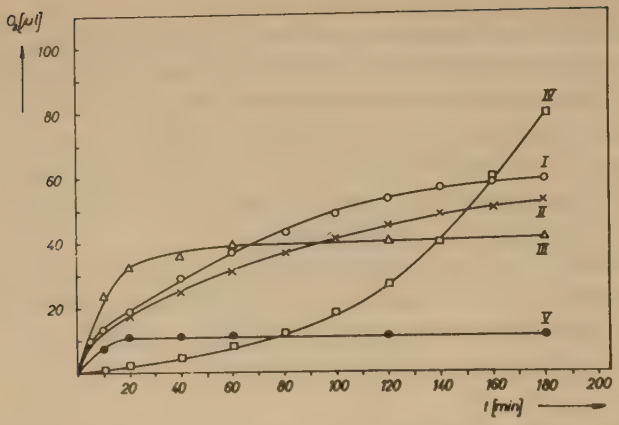


Abb. 7: Fermentative Arbutin-Oxydation in Gegenwart von d-Catechin und l-Epicatechin
Reaktionsansatz:
I: 0,5ml Wasser mit 3,0mg Arbutin; 1,5ml Puffer pH 6,6 mit 300 γ l-Epicatechin bzw.
II: 300 γ d-Catechin bzw.
III: 600 γ d-Catechin; 0,5ml Ferment 1+19; 25°.
IV: 3,0mg Arbutin
V: 300 γ d-Catechin.

Vergrößerte man die eingesetzten Catechin-Konzentrationen, so war bei Verwendung von 600 γ d-Catechin bzw. l-Epicatechin die Anfangsgeschwindigkeit sehr groß, nach 50 Minuten war jedoch kaum mehr eine Sauerstoffaufnahme festzustellen. Als sehr anschaulich erwies sich der Vergleich der Oxydation von 3,0mg Arbutin in Gegenwart von 50 γ bzw. 1500 γ d-Catechin mit einer Fermentverdünnung 1+19. Mit der geringen Catechinmenge war nach 180 Minuten mehr Sauerstoff verbraucht als mit 1500 γ d-Catechin (Abb. 8).

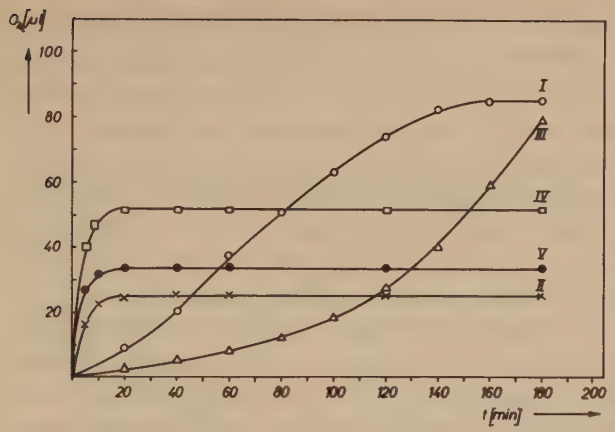


Abb. 8: Fermentative Arbutin-Oxydation in Gegenwart von d-Catechin

Reaktionsansatz:

I: 0,5ml Wasser mit 3,0mg Arbutin; 1,5ml Puffer pH 6,6 mit 50 γ d-Catechin bzw.

II: 1500 γ d-Catechin; 0,5ml Ferment 1+19; 25°.

III: 3,0mg Arbutin

IV: 1500 γ d-Catechin

V: 600 γ d-Catechin

50 γ d-Catechin zeigten keinen manometrisch meßbaren Sauerstoffverbrauch.

Wahrscheinlich ist diese im Verlaufe der Reaktion zu beobachtende Verringerung der Sauerstoffaufnahme auf Inhibitionen zurückzuführen. Diese können kompetetiver Art sein, indem das fermentativ gebildete Catechin-Chinon die Oxydation des Arbutins bei Reaktionsbeginn zunächst fördert; im weiteren Verlauf der Reaktion konkurrieren jedoch das Arbutin und das Catechin um das Ferment. Die Hemmungen können jedoch auch nichtkompetetiver Art sein, indem das Catechin-Oxydationsprodukt schädigend auf das Ferment wirkt.

c) Beeinflussung der fermentativen Arbutin-Oxydation durch Gallussäure

Als weitere natürlich vorkommende Begleitsubstanz wurde die Gallussäure in die Untersuchungen miteinbezogen. Die Versuche wurden bei pH 6,0 durchgeführt, um die Autoxydation der Gallussäure weitgehend zu unterbinden. Unter diesen Bedingungen zeigte das Arbutin mit einer Fermentverdünnung 1+9 keinen Sauerstoffverbrauch mehr. Setzte man zu diesem Ansatz eine kleine Menge Gallussäure (500 γ pro 2,5ml Reaktionslösung), so trat ein starker Sauerstoffverbrauch auf, obwohl diese Gallussäure-Menge allein ebenfalls innerhalb der Versuchszeit keinen manometrisch meßbaren Sauerstoffverbrauch ergab. Vergrößerte man den Zusatz an Gallussäure, so wurde die Sauerstoffaufnahme, d.h. die Reaktionsgeschwindigkeit des Gemisches, wieder kleiner (Abb. 9).

Dies dürfte auf eine Hemmwirkung größerer Mengen der Trihydroxybenzoesäure auf das Enzym zurückzuführen sein(22). Trotzdem war aber noch in dem Gemisch 5,0mg Arbutin + 5,0mg Gallussäure unter den vorliegenden Versuchsbedingungen eine deutlich verstärkte Oxydation gegenüber der Einwirkung des Ferments auf das Arbutin allein zu erkennen. Sehr anschaulich verliefen auch Kupplungsversuche mit BESTHORN's Hydrazon. Versetzte man jeweils 5,0mg Arbutin und 0,5mg Gallussäure mit oben genanntem Reagenz und einer Fermentverdünnung 1+9 bei pH 6,0, so trat jeweils innerhalb von 5 Minuten Rotfärbung auf, während das Gemisch 5,0mg Arbutin + 0,5mg Gallussäure nach 30-60 Sekunden in Gegenwart des Hydrazons rotgefärbt war. 5,0mg Gallussäure allein zeigten ebenfalls nach 30-60 Sekunden Rotfärbung, die etwas schwächer war als die Färbung in dem Gemisch von 5,0mg Gallussäure + 5,0mg Arbutin.
Durch diese Versuche wird wieder einmal gezeigt,daß die Empfindlichkeit der manometrischen WARBURG-Methodik nicht in allen Fällen ausreichend ist. 0,5mg Arbutin bzw. 0,5mg Gallussäure ergeben bei Einwirkung einer Fermentverdünnung 1+9 bei pH 6,0 keinen manometrisch meßbaren Sauerstoff-

Verbrauch, obwohl diese Mengen einwandfrei oxydiert wurden, wie durch Kupplung mit BESTHORN's Hydrazon gezeigt werden konnte .

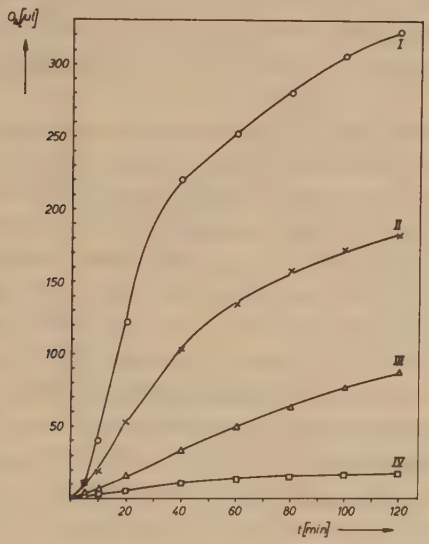


Abb.9: Fermentative Arbutin-Oxydation in Gegenwart von Gallussäure

Reaktionsansatz:

I: 0,5ml Wasser mit 5,0mg Arbutin; 1,5ml Puffer pH 6,0 mit 0,5mg Gallussäure bzw.

II: 1,0mg Gallussäure bzw.

III: 5,0mg Gallussäure; 0,5ml Ferment 1+9; 25°.

IV: 5,0mg Gallussäure

5,0mg Arbutin bzw. 0,5mg Gallussäure zeigten keinen manometrisch meßbaren Sauerstoffverbrauch.

Die Mitteleinsätze der WARBURG-Gefäße waren zur Absorption von CO_2 mit 0,2ml NaOH (10%) versetzt.

5. Der Einfluß von Emulsin auf die Arbutin-Oxydation

Da sowohl in Bärentraubenblättern als auch in Birnenblättern die ß-Glykosidase Emulsin vorkommt und letztere die Spaltung des Arbutins in Hydrochinon und Glukose hervorruft, lag der Gedanke nahe, Emulsin in die Untersuchungen über die Oxydierbarkeit des Arbutins mit Phenoloxydase einzubeziehen.
Bei der Ernte der Droge übt dieses Enzym seine Wirkung aus und kann, wenigstens teilweise, das Arbutin spalten. Es war anzunehmen, daß durch diese Spaltung auch die Einwirkung der Phenoloxydase auf das Arbutin beeinflußt wird, da das freigesetzte Hydrochinon von der Phenoloxydase allein nicht oxydiert werden kann, sondern vielmehr als Inhibitor der Fermentaktivität auftritt.
Die Ausführung der Versuche stieß zunächst auf einige Schwierigkeiten. Das pH-Optimum des Emulsins liegt bei 4,4 bis 5,0 (23). Diese pH-Bereiche sind aber für die Wirkung der Phenoloxydase ungünstig, da deren pH-Optimum bei 6,0 bis 7,0 liegt und sie unterhalb pH 5,0 fast wirkungslos ist (3). Es wurde deshalb bei pH 6,0 und entsprechend stärkeren Fermentkonzentrationen gearbeitet.
Es konnte gezeigt werden, daß unter den vorliegenden Versuchsbedingungen in Gegenwart von Emulsin von Versuchsbeginn an die Arbutin-Oxydation schneller einsetzte als ohne die Anwesenheit der Glykosidase (Abb.10).
Der gleiche Versuch wurde bei pH 7,0 mit der Fermentkonzentration 1+9 durchgeführt. Hierbei trat kein erhöhter Sauerstoffverbrauch im System Ferment/Arbutin/Emulsin auf. Es lag also nahe, daß die fermentative Glykosidspaltung einen Einfluß auf diesen vermehrten Sauerstoffverbrauch hat. Dies erforderte jedoch den Beweis, daß bei pH 6,0 das Emulsin noch spaltend wirkt, während bei pH 7,0 keine Arbutin-Spaltung mehr erfolgen dürfte,weil bei diesem pH-Wert in Gegenwart von Emulsin keine vermehrte Sauerstoffaufnahme gefunden wurde.

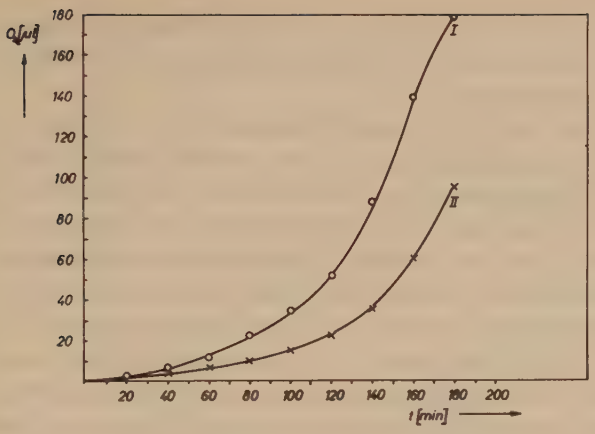


Abb. 10: Fermentative Arbutin-Oxydation in Gegenwart von Emulsin
Reaktionsansatz:
I: 0,5ml Wasser mit 3,0mg Arbutin; 1,5ml Puffer pH 6,0 mit 3,0mg Emulsin; 0,5ml Ferment 1+1; 25°.
II: 3,0mg Arbutin.

Zu diesem Nachweis wurde eine abgeänderte Methode von FRIEDRICH benutzt (24). Der Reaktionsansatz

1,0ml Wasser mit 10,0mg Arbutin
4,0ml Puffer pH 6,0 mit 10,0mg Emulsin

wurde eine Stunde in der WARBURG- Apparatur bei 25°C geschüttelt. Danach wurde das Gemisch am Rückflußkühler zur Inaktivierung des Ferments kurz zum Sieden erhitzt. Nach Abkühlen und Filtrieren der Lösung wurde 0,1ml der Flüssigkeit auf Chromatographier-Papier SCHLEICHER & SCHÜLL Nr. 2043 bM aufgetragen. Als Fließmittel wurde Butanol-Eisessig-Wasser (4+1+5) und als Entwicklungsflüssigkeit Phosphormolybdänsäure/methanolische Kalilauge verwendet. Nach dem Trocknen zeigte das Chromatogramm blaue Arbutinflecken (R_f = 0,38) und blaue Hydrochinonflecken (R_f = 0,74).

Der gleiche Versuch bei pH 7,0 und drei Stunden Emulsineinwirkung zeigte auf dem Papierchromatogramm kein abgespaltenes Hydrochinon.
Wie konnte die Reaktion gedeutet werden ? Wahrscheinlich spielt das hydrolytisch abgespaltene Hydrochinon eine Rolle, da eine Verstärkung der Reaktion nur innerhalb des Wirkungsbereiches des Emulsins beobachtet werden kann. Als zu beweisende Arbeitshypothese wurde deshalb angenommen, daß das Hydrochinon, das von der Phenoloxydase allein nicht oxydiert werden kann(3;25), sekundär durch ein fermentatives Oxydationsprodukt des Arbutins oxydiert wird. Solche sekundären Produkte erweitern sehr stark den Wirkungsbereich dieses Enzyms und wurden erstmals von KUBOWITZ beschrieben, der fand, daß Ascorbinsäure von der Phenoloxydase allein nicht oxydiert wird, sondern nur in Gegenwart von Spuren Brenzkatechin angegriffen wird (9;10).
Als fermentatives Oxydationsprodukt, das diese sekundäre Reaktion vermittelt, kommt in erster Linie das durch die Einwirkung der Phenoloxydase aus dem Arbutin nach Hydroxylierung und Oxydation entstehende Chinon in Frage. Dieses müßte dann das Hydrochinon zum p-Benzochinon oxydieren, womit ein erhöhter Sauerstoffverbrauch einhergeht.
In einem Modellversuch war nun festzustellen, ob die Phenoloxydase in Gegenwart von Arbutin Hydrochinon oxydieren kann. Hierzu wurde zunächst Arbutin zwecks Anreicherung einer gewissen Menge Oxydationsproduktes mit dem Ferment allein oxydiert; nach 70 Minuten wurde zu dem Ansatz das Hydrochinon gegeben. Es zeigte sich, daß sowohl bei pH 6,0 als auch bei pH 7,0 mit der Zugabe des Hydrochinons ein vermehrter Sauerstoffverbrauch auftritt (Abb.11 u.12).
Als weitere interessante Beobachtung wurde bei diesen Versuchen festgestellt, daß bei der Zugabe gleicher Mengen Hydrochinon sofort bei Versuchsbeginn keine Verstärkung, sondern eine Hemmung der Arbutin-Oxydation eintrat.

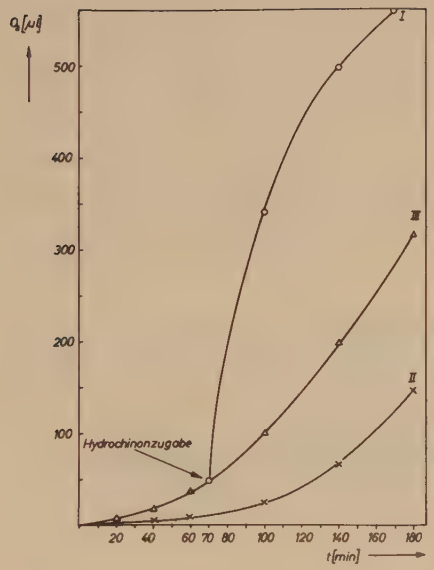


Abb. 11: Fermentative Arbutin-Oxydation in Gegenwart von Hydrochinon (pH 6,0)
Reaktionsansatz:
I: 1,0ml Wasser mit 6,0mg Arbutin; 3,0ml Puffer pH 6,0 mit 2,43mg Hydrochinon nach 70 Min. zugesetzt bzw.
II: von Reaktionsbeginn anwesend; 1,0ml Ferment 1+1; 25°.
III: 6,0mg Arbutin.

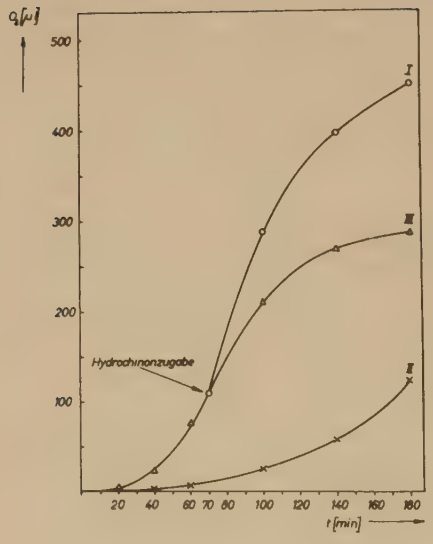


Abb. 12: Fermentative Arbutin-Oxydation in Gegenwart von Hydrochinon (pH 7,0)

Reaktionsansatz:

I: 1,0ml Wasser mit 6,0mg Arbutin; 3,0ml Puffer pH 7,0 mit 2,43mg Hydrochinon nach 70 Min. zugesetzt bzw.

II: von Reaktionsbeginn anwesend; 1,0ml Ferment 1+9; 25°.

III: 6,0mg Arbutin.

Es sind also zusammengefaßt drei Beobachtungen festzuhalten:

1) In Gegenwart von Emulsin findet bei pH 6,0 eine Beschleunigung der fermentativen Oxydation von Arbutin statt. Diese Beschleunigung erfolgt nicht bei pH 7,0.
2) Setzt man zu dem System Ferment/Arbutin im Verlaufe der Oxydation (in unserem Falle nach 70 Minuten) Hydrochinon (hier 2,43mg) zu, so findet bei pH 6,0 und pH 7,0 Verstärkung der Oxydation statt.
3) Setzt man die gleiche Hydrochinon-Menge mit Reaktionsbeginn zu, so findet eine Hemmung der Oxydation bei pH 6,0 und pH 7,0 statt.

Bei der weiteren Untersuchung des Systems Ferment/Arbutin/Hydrochinon mußte jedoch festgestellt werden, ob der vermehrte Sauerstoffverbrauch nicht auch durch eine Überträgerwirkung des fermentativ gebildeten Oxydationsproduktes des Arbutins gegenüber dem Emulsin bzw. gegenüber der durch das Emulsin in Freiheit gesetzten Glukose hervorgerufen wird.

6. Die Einwirkung der Phenoloxydase auf Emulsin und Glukose

Eine Oxydation des Emulsins durch die Phenoloxydase war nicht auszuschließen, da freie Hydroxyl-Gruppen von Tyrosinresten oder Sulfhydryl-Gruppen von Cysteinresten eine Oxydation möglich erscheinen ließen. Es konnte jedoch weder bei der Einwirkung des Fermentes allein noch nach Zusatz von Überträgern, wie Kaffeesäure oder Brenzkatechin, ein Hinweis auf eine Oxydation erhalten werden.
Auch eine Oxydation der Glukose konnte von vornherein nicht verworfen werden. HEIMANN und HEINRICH zeigten, daß Glukose-6-phosphat unter Verwendung von TPN (Codehydrase II) und NEGELEIN's Zwischenferment (Alkoholdehydrase) mit Phenoloxydase oxydiert wird (26).Reine Glukose ließ sich

mit Phenoloxydase jedoch in Gegenwart von Arbutin bzw. Arbutin/Hydrochinon bei pH 6,0 nicht oxydieren. Die Glukose wurde in unterschiedlichen Konzentrationen hinzugegeben. In allen Versuchen trat kein erhöhter Sauerstoffverbrauch gegenüber den entsprechenden Vergleichsansätzen auf. Diese Versuche bewiesen, daß der erhöhte Sauerstoffverbrauch nicht auf eine Oxydation des Emulsins bzw. der Glukose zurückzuführen ist.

7. In vitro-Untersuchungen in dem System Ferment/Arbutin/Hydrochinon

Zur Deutung der beschriebenen Reaktion war es notwendig, näher die Kinetik des Systems Ferment/Arbutin/Hydrochinon zu untersuchen.

a) Der Einfluß der Fermentkonzentration

Erwartungsgemäß erfolgte bei konstanter Hydrochinonkonzentration und steigenden Fermentkonzentrationen eine Vermehrung des Sauerstoffverbrauchs in der Zeiteinheit. In allen Fällen übte jedoch das Hydrochinon, sofern es sich von Beginn der Reaktion an in dem Reaktionsgemisch befand, noch eine inhibierende Wirkung auf die Oxydation aus(Abb.13).

b) Der Einfluß der Arbutinkonzentration

Unter der Voraussetzung, daß die beobachtete Hemmung, wenigstens teilweise, kompetetiver Art ist, müßte sie mit steigender Arbutinkonzentration aufgehoben werden und vielleicht sogar anfangs in eine aktivierte Reaktion übergehen, da das in größerer Menge vorkommende Arbutin-Oxydationsprodukt sekundär relativ kleine Hydrochinon-Mengen oxydieren kann. Diese Überlegungen wurden durch das Experiment bestätigt (Abb. 14). 1,0mg Hydrochinon unterdrückte weitgehend die Oxydation von 1,0mg Arbutin,während die gleiche

Hydrochinon-Menge die Oxydation von 10,0mg Arbutin innerhalb von 240 Minuten nicht hemmt, sondern vielmehr eine Beschleunigung zu erkennen ist.

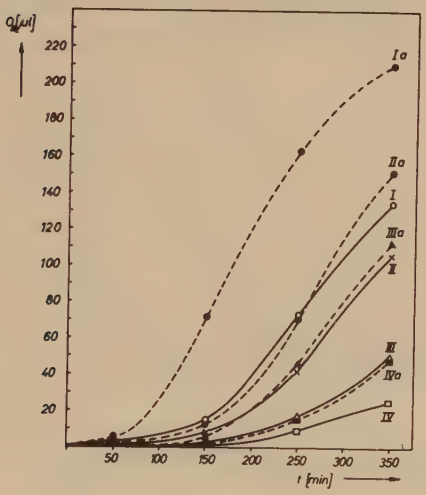


Abb. 13: Einfluß der Ferment-Konzentration in dem System Ferment/Arbutin/Hydrochinon
Reaktionsansatz:
I: 0,5ml Wasser mit 3,0mg Arbutin; 1,5ml Puffer pH 6,0 mit 1,22mg Hydrochinon; 0,5ml Ferment 1+1 bzw. 1+2 (II) bzw. 1+4 (III) bzw. 1+8 (IV)
Ia: 0,5ml Wasser mit 3,0mg Arbutin; 1,5ml Puffer pH 6,0; 0,5ml Ferment 1+1 bzw. 1+2 (IIa) bzw. 1+4 (IIIa) bzw. 1+8 (IVa); 25°.

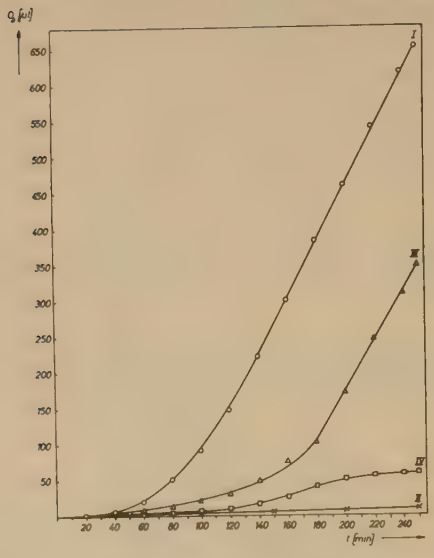


Abb. 14: Einfluß der Arbutin-Konzentration in dem System Ferment/Arbutin/Hydrochinon

Reaktionsansatz:

I: 0,5ml Wasser mit 10,0mg Arbutin bzw.

II: 1,0mg Arbutin; 1,5ml Puffer pH 6,0 mit 1,0mg Hydrochinon; 0,5ml Ferment 1+1: 25°.

III: 10,0mg Arbutin

IV: 1,0mg Arbutin

0,1mg Arbutin + 1,0mg Hydrochinon zeigten keinen Sauerstoffverbrauch.

c) Der Einfluß der Hydrochinonkonzentration

Es wurde festgestellt, daß bei Zusatz von 0,1mg Hydrochinon zum Ansatz Ferment/Arbutin zunächst ein größerer Sauerstoffverbrauch auftritt als bei der Oxydation der entsprechenden Arbutinmenge allein. Nach 160 Minuten wurde unter den entsprechenden Versuchsbedingungen der Sauerstoffverbrauch in dem Gemisch kleiner, während Arbutin allein noch stärker oxydiert wurde (Abb.15).

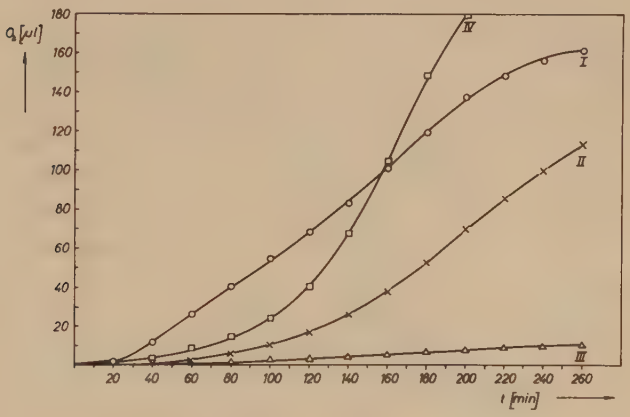


Abb. 15: Einfluß der Hydrochinon-Konzentration in dem System Ferment/Arbutin/Hydrochinon
Reaktionsansatz:
I: 0,5ml Wasser mit 3,0mg Arbutin; 1,5ml Puffer pH 6,0 mit 0,1mg Hydrochinin bzw.
II: 0,5mg Hydrochinon bzw.
III: 5,0mg Hydrochinon; 0,5ml Ferment 1+1; 25°.
IV: 3,0mg Arbutin.

0,1mg Hydrochinon wirken zu Beginn der Reaktion noch nicht als Inhibitor, da es im Vergleich zum Arbutin in sehr geringer Menge vorliegt. Je mehr Hydrochinon zugesetzt wurde, desto geringer war der Sauerstoffverbrauch.
Die Verminderung der Sauerstoffaufnahme in dem Ansatz mit 0,1mg Hydrochinon kann mit einer Einwirkung des im Verlaufe der Reaktion entstandenen p-Benzochinons auf das Enzym erklärt werden. In der folgenden Versuchsreihe konnte gezeigt werden, daß steigende Chinon-Mengen eine Verlangsamung der Arbutin-Oxydation bewirken (Abb.16).

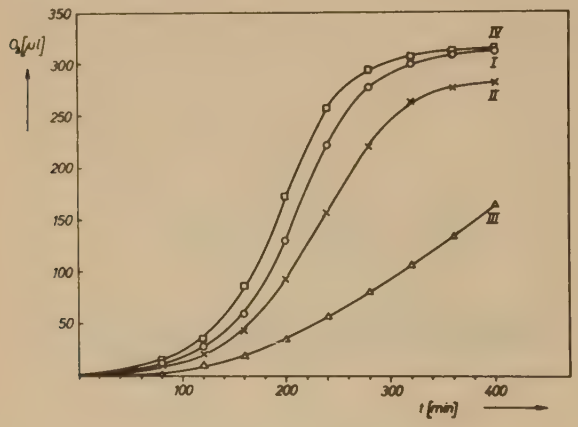


Abb. 16: Fermentative Arbutin-Oxydation in Gegenwart von p-Benzochinon
Reaktionsansatz:
I: 0,5ml Wasser mit 3,0mg Arbutin;1,5ml Puffer pH 6,0 mit 0,1mg p-Benzochinon bzw.
II: 1,0mg p-Benzochinon bzw.
III: 3,0mg p-Benzochinon; 0,5ml Ferment 1+1; 25°.
IV: 3,0mg Arbutin

Dieser Vorgang dürfte auf eine irreversible Eiweißschädigung des Ferment- Eiweißes durch das p-Chinon zurückzuführen sein (22).

d) Einfluß des Zeitpunktes der Hydrochinon-Zugabe

Die vorangegangenen Versuche hatten gezeigt, daß das Hydrochinon, sofern es zu Reaktionsbeginn vorhanden ist und in nicht zu geringen Konzentrationen oder in zu kleinen Konzentrationsverhältnissen zum Arbutin vorliegt, die fermentative Oxydation von Arbutin hemmt. Es war bereits berichtet worden, daß bei Zusatz des Hydrochinons zu der bereits laufenden Reaktion eine Beschleunigung der Oxydation zu beobachten ist. Diese zeitliche Abhängigkeit sollte näher untersucht werden.

Hierzu wurde das Hydrochinon zu verschiedenen Zeiten nach Beginn der Fermenteinwirkung auf das Arbutin hinzugegeben. Je später das Hydrochinon zugesetzt wurde, desto größer wurde der Sauerstoffverbrauch. Den geringsten Sauerstoffverbrauch wies das System Ferment/Arbutin auf, in dem das Hydrochinon zehn Minuten nach Beginn der Reaktion zugesetzt wurde; den größten Sauerstoffverbrauch zeigte das System bei Hydrochinon-Zugabe nach 210 Minuten (Abb. 17).

Dies konnte leicht damit erklärt werden, daß bei länger laufender Reaktion die Menge Arbutin-Oxydationsprodukt, die für die sekundäre Einwirkung auf das Hydrochinon verantwortlich ist, größer wird. Infolgedessen ist auch die Menge Hydrochinon, die in nichtfermentativer sekundärer Oxydation oxydiert wird, größer.

Ein entsprechender Ansatz, in dem Hydrochinon von Anfang an vorhanden war, verbrauchte noch weniger Sauerstoff als derjenige, in dem das Hydrochinon nach zehn Minuten zugesetzt wurde. Hierbei kann nur noch sehr wenig Arbutin-Oxydationsprodukt, das für die sekundäre Einwirkung auf das Hydrochinon benötigt wird, infolge des inhibierenden Einflusses des 1,4-Dihydroxybenzols auf das Ferment gebildet werden.

Diese Theorie konnte auch dadurch bestätigt werden, daß bei Zusatz wechselnder Mengen Hydrochinon nach konstanter Reaktionsdauer (60 Minuten) die Sauerstoffaufnahme mit steigender Hydrochinon-Menge größer wurde (Abb. 18).

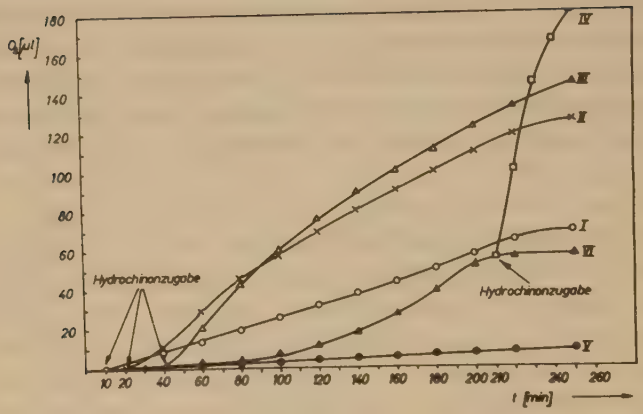


Abb. 17: Einfluß des Zeitpunktes der Hydrochinon-Zugabe in dem System Ferment/Arbutin/Hydrochinon
Reaktionsansatz:

I: 0,5ml Wasser mit 1,0mg Arbutin; 1,0ml Puffer pH 6,0; 0,5ml Puffer pH 6,0 mit 1,0mg Hydrochinon nach 10 Min. bzw.

II: nach 20 Min. bzw.

III: nach 40 Min. bzw.

IV: nach 210 Min. bzw.

V: sofort zugesetzt; 0,5ml Ferment 1+1; 25°.

VI: 1,0mg Arbutin.

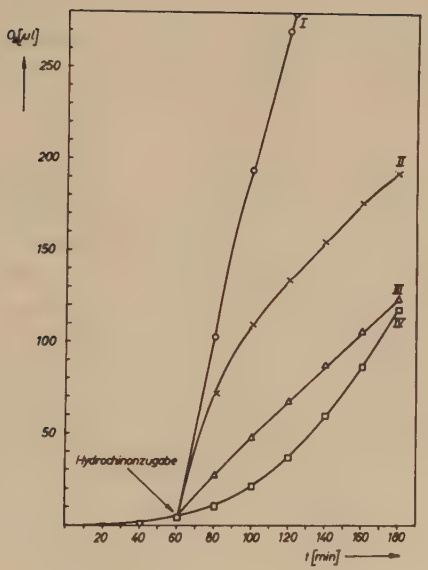


Abb. 18: Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Hydrochinon-Konzentration in dem System Ferment/Arbutin/Hydrochinon
Reaktionsansatz:

I: 0,5ml Wasser mit 3,0mg Arbutin; 1,5ml Puffer pH 6,0 mit 5,0mg Hydrochinon bzw.

II: 1,0mg Hydrochinon bzw.

III: 0,1mg Hydrochinon nach 60 Min. zugesetzt ; 0,5ml Ferment 1+1; 25°.

IV: 3,0mg Arbutin.

e) Einfluß des Ausmaßes der fermentativen Arbutinspaltung

Die bisherigen Versuche hatten gezeigt, daß bei Vorliegen sehr kleiner Hydrochinon-Mengen zu Beginn der fermentativen Oxydation des Arbutins eine Beschleunigung der Oxydation eintritt; werden die Hydrochinon-Mengen erhöht, erfolgt eine Hemmung. Andererseits konnte bei Anwesenheit von Emulsin eine beschleunigte Oxydation festgestellt werden, was auf die enzymatische Freisetzung kleinerer Mengen Hydrochinon hinweist.

Wie groß dürfen nun die Arbutin-Mengen sein, die auf diesem Wege glykosidatisch umgesetzt werden, damit die Reaktion noch beschleunigt ist? Hierzu wurde ein Modellversuch durchgeführt, in dem die enzymatische Spaltung des Arbutins in Hydrochinon und Glukose nachgeahmt wurde. Im ersten Versuch wirkte die Phenoloxydase auf 3,0mg Arbutin, d.h. auf 100% Glykosid ein; im zweiten Versuch waren mit Beginn der Einwirkung des Oxydationsenzyms 10% der ursprünglichen Glykosid-Menge bereits hydrolytisch gespalten, so daß der Reaktionsansatz nur noch 90% Arbutin (=2,7mg) und 0,11mg freigesetztes Hydrochinon enthielt. Die freigesetzte Glukose brauchte bei diesen Ansätzen nicht berücksichtigt zu werden, da sie die fermentative Arbutin-Oxydation nicht beeinflußt. Die Versuchsreihe hatte folgende Zusammensetzung :

100%	Arbutin	=	3,0mg	Arbutin				
90%	"	=	2,7mg	"	+	0,11mg	Hydrochinon	=10% Spal-
80%	"	=	2,4mg	"	+	0,22mg	"	=20% tung
70%	"	=	2,1mg	"	+	0,33mg	"	=30% "
60%	"	=	1,8mg	"	+	0,44mg	"	=40% "
50%	"	=	1,5mg	"	+	0,55mg	"	=50% "
40%	"	=	1,2mg	"	+	0,66mg	"	=60% "
30%	"	=	0,9mg	"	+	0,77mg	"	=70% "
20%	"	=	0,6mg	"	+	0,88mg	"	=80% "
10%	"	=	0,3mg	"	+	0,99mg	"	=90% "

Die Auswertung dieses Versuchs ergab, daß bei einer 10 bis etwa 40%igen Arbutinspaltung Sauerstoff-Mehrverbrauch gegenüber der Oxydation des Arbutins allein auftrat. Das war auch auf Grund der früher durchgeführten Versuche zu erwarten, da bei einer 10 bis 40%igen Arbutinspaltung noch Arbutin im großen Überschuß vorhanden ist. Bei einer entsprechenden stärkeren Arbutinspaltung trat eine Hemmung der Arbutin-Oxydation auf, da hierbei bereits zuviel Hydrochinon gebildet wird und letzteres als Inhibitor wirkt (Abb.19).

Daß sich das Ausmaß der Arbutinspaltung durch das Emulsin selbst ebenfalls sehr anschaulich darstellen läßt, konnte durch die folgenden Versuche gezeigt werden, bei denen die Phenoloxydase zu verschiedenen Zeiten nach Reaktionsbeginn zu einem Ansatz Emulsin/Arbutin hinzugesetzt wurde. Theoretisch war zu erwarten, daß bei längerer Emulsin-Einwirkung auf Arbutin soviel Hydrochinon gebildet wird, daß bei der späteren Fermentzugabe die Arbutin-Oxydation gehemmt wird. Die Reaktion wurde bei pH 5,0 und pH 6,0 untersucht. Papierchromatographisch konnte nachgewiesen werden, daß bei beiden pH-Werten durch das Emulsin eine Spaltung des Arbutins erfolgt. Bei pH 5,0 war die Spaltung jedoch stärker als bei pH 6,0, wie aus den Intensitäten der Flecke des Arbutins und Hydrochinons geschlossen werden konnte.

Am eindeutigsten waren die Ergebnisse bei den bei pH 5,0 durchgeführten Versuchen, bei denen mit 1,0mg Arbutin und unverdünnter Phenoloxydase gearbeitet wurde. Setzte man das Oxydationsenzym nach einer Emulsin-Einwirkung von 90 Minuten zu, so lag der Gesamt-Sauerstoffverbrauch noch etwas höher als bei der Oxydation des Arbutins allein. Die abgespaltene Hydrochinon-Menge ist wahrscheinlich so klein, daß noch eine geringe Aktivierung der Oxydation erfolgen kann. Fermentzugaben nach 150 und 240 Minuten zeigten eine deutliche Hemmung der Arbutin-Oxydation, was auf eine weiter fortgeschrittene Spaltung des Arbutins hinweist (Abb. 20).

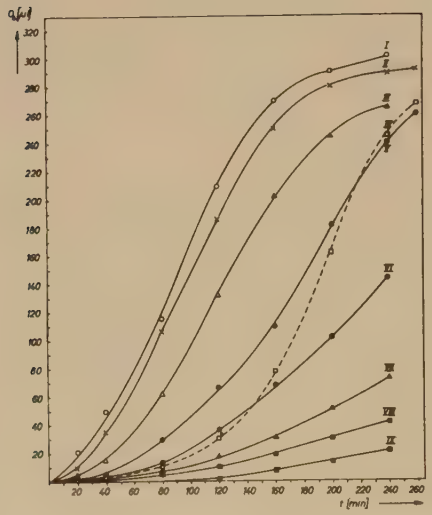


Abb.19: Einfluß des Ausmaßes der fermentativen Arbutin-Spaltung

Reaktionsansatz:

IV: 0,5ml Wasser mit 3,0mg Arbutin (=100%); 1,5ml Puffer pH 6,0; 0,5ml Ferment 1+1; 25°.

I-III: entspricht 10-30%iger Spaltung

V- IX: entspricht 40-80%iger Spaltung
90%ige Spaltung zeigte keinen Sauerstoff-verbrauch.

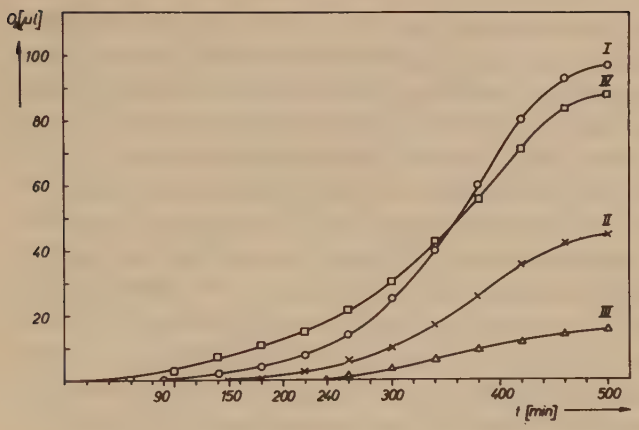


Abb.20: Einfluß des Zeitpunktes der Fermentzugabe in dem System Emulsin/Arbutin
Reaktionsansatz:
I: 0,5ml Wasser mit 1,0mg Arbutin; 1,5 ml Puffer pH 5,0 mit 3,0mg Emulsin; 0,5ml Ferment nach 90 Min. bzw.
II: 150 Min. bzw.
III: 240 Min. zugesetzt; 25°.
IV: 1,0mg Arbutin.

C: Zusammenfassung

Es konnte festgestellt werden, daß eine Phenoloxydase aus Kartoffeln Arbutin oxydiert. Der Verlauf der Oxydation hat das typische Bild der fermentativen Einwirkung auf monophenolische Verbindungen. Das Ausmaß der Oxydation kann entscheidend durch die Anwesenheit anderer, auch natürlich in Bärentrauben - und Birnenblättern vorkommender phenolischer Begleitstoffe beeinflußt werden. So wurde in Anwesenheit geringer Mengen von Chlorogensäure, Isochlorogensäure, d-Catechin, l-Epicatechin und Gallussäure eine Verringerung der Induktionsperiode und eine Beschleunigung der Oxydation festgestellt. Andererseits ergaben größere Zusätze der drei letzten Verbindungen auch Inhibitionen der Arbutin-Oxydation, die wenigstens zum Teil kompetetiver Art sein dürften. In Anwesenheit der Glykosidase Emulsin nimmt die Reaktion Phenoloxydase/Arbutin einen anderen Verlauf, hierbei konnte bei pH 6,0 erhöhter Sauerstoffverbrauch festgestellt werden. Für diese Erscheinung wurde folgende Deutung gefunden :

Das Emulsin bewirkt eine teilweise glykosidatische Spaltung des Arbutins in Hydrochinon und Glukose. Hierdurch ist die Möglichkeit gegeben, daß sich ein zweites fermentatives Oxydations-System ausbildet. Das freigesetzte Hydrochinon kann zwar von der Phenoloxydase allein nicht oxydiert werden, in Gegenwart von Arbutin findet jedoch durch Vermittlung des fermentativ gebildeten Arbutin-Oxydationsproduktes eine sekundäre, nichtfermentative Oxydation des Hydrochinons zum p-Benzochinon statt. Diese Oxydation verläuft unter der Voraussetzung, daß das Verhältnis der Arbutin-Konzentration groß ist gegenüber der Hydrochinon-Konzentration, schneller ab, als die Oxydation des Arbutins allein. Verändert sich jedoch

das Verhältnis Arbutin-Konzentration zu Hydrochinon-Konzentration zu Gunsten des Hydrochinons, so tritt eine von der Hydrochinon-Konzentration abhängige Inhibition ein. Es konnte gefunden werden, daß bis zu einer 40%igen Arbutin-Spaltung noch eine Beschleunigung der Oxydation eintritt; bei stärkerer Spaltung geht die aktivierte Reaktion in eine gehemmte Reaktion über. Daneben ist aber auch die Menge des vorhandenen Arbutin-Oxydationsproduktes entscheidend für den Ablauf der Reaktion verantwortlich. Ist eine bestimmte, nicht zu klein bemessende Menge Hydrochinon zu Beginn der Einwirkung der Phenoloxydase auf das Arbutin in der Reaktionslösung anwesend, so findet eine Hemmung der Oxydation statt. Setzt man dieselbe Hydrochinon-Menge jedoch zu der Reaktionslösung erst hinzu, wenn die Oxydation des Arbutins bereits längere Zeit läuft, so ist vielfach eine Aktivierung der Reaktion zu beobachten, da sich in der Zwischenzeit genügend Arbutin- Oxydationsprodukt zu einer ausreichenden Oxydation des Hydrochinons angesammelt hat.

D: Literaturverzeichnis

1 F.BERGER: Handbuch der Drogenkunde Bd.2, 356ff. J.Springer Verlag, Wien (1950)

2 H.MOSER: Pharmazie 3, 433ff. (1948)

3 O.HOFFMANN-OSTENHOF: Enzymologie 557ff.J.Springer Verlag, Wien (1954)

4 K.H.FRÖMMING: Arch.Pharmaz.Ber.dtsch.pharmaz.Ges. 290/62, 616ff. (1957)

5 K.HERRMANN: Pharmazie 9, 670ff. (1954)

6 H.S.RAPER: Ergebn. Enzymforsch.1, 270ff.Akademie-Verlag, Leipzig (1932)

7 H.FRIEDRICH: Arch.Pharmaz.Ber.dtsch.pharmaz.Ges. 288/60, 583ff. (1955)

8 A.H.WILLIAMS: Nature (London), 175, 213 (1955)

9 F.KUBOWITZ: Biochem.Z. 292, 221 (1937)

10 F.KUBOWITZ: Biochem.Z. 299, 32 (1938)

11 E.BAMANN u.K.MYRBÄCK: Die Methoden der Fermentforschung Bd. 2, 987, G.Thieme Verlag, Leipzig (1941)

12 E.BAMANN u.K.MYRBÄCK: Die Methoden der Fermentforschung Bd.1, 786, G.Thieme Verlag, Leipzig (1941)

13 M. GRAUBARD u.J.NELSON: J.biol.Chemistry 111, 757 (1935), J.biol. Chemistry 112, 135 (1935)

14 E.BESTHORN: Ber.dtsch.chem.Ges. 43, 1519ff (1910)

15 G.SCHENCK, K.H.FRÖMMING u.H.KASTNER: Mathem.Naturw. Diss. 40, FU Berlin (1959)

16 S.HÜNIG u.Mitarbeiter: Angew.Chem. 70, 215 (1958)

17 G.SCHENCK,K.H.FRÖMMING u.H.KASTNER: Arch, Pharmaz. Ber.dtsch.pharmaz.Ges. 293/65,251ff.(1960)

18 G.SCHENCK,K.H.FRÖMMING u.E.SOMMER: Mathem.Naturw. Diss. 37ff. FU Berlin (1959)

19 G.SCHENCK,K.H.FRÖMMING u.O.LINDE: Mathem.Naturw. Diss. 21, FU Berlin (1961)

20 P.KARRER: Lehrbuch d.organischen Chemie 713, G.Thieme Verlag, Stuttgart (1959)

21 G.SCHENCK,K.H.FRÖMMING u.O.LINDE: Mathem.Naturw. Diss. 14, FU Berlin (1961)

22 K.H.FRÖMMING: Arch.Pharmaz.Ber.dtsch.pharmaz.Ges. 294/66, 531ff. (1961)

23 O.HOFFMANN-OSTENHOF: Enzymologie 223, J. Springer Verlag, Wien (1954)

24 H. FRIEDRICH: Arch.Pharmaz.Ber.dtsch.pharmaz.Ges. 288/60, 583 (1955)

25 W.H.MILLER u.C.R.DAWSON: J.Amer.Chem.Soc. 63, 3368 (1941)

26 W.HEIMANN u.B.HEINRICH: Arch.Pharmaz.Ber.dtsch. pharmaz.Ges. 293/65, 598ff. (1960)

27 H.J.SCHÜTZ: Mathem.Naturw.Diss. FU Berlin (1962)

L e b e n s l a u f

Am 8.Mai 1935 wurde ich, Kurt Ewald Adolf D o l l i n g , als Sohn des Ingenieurs Alfred Dolling und seiner Ehefrau Käthe, geb. Wärk, in Berlin geboren.

Ich besuchte von 1941 bis 1945 die Grundschule und von 1945 bis 1954 die 3. Oberschule Wissenschaftlichen Zweiges, heute Hermann Ehlers- Schule, in Berlin- Steglitz, an der ich 1954 das Abitur bestand.

Von April 1954 bis März 1956 war ich als Praktikant in der Gertruden-Apotheke in Berlin-Lichterfelde tätig und legte 1956 das Pharmazeutische Vorexamen in Berlin ab.

Anschließend begann ich das Pharmazie-Studium an der Freien Universität Berlin und bestand 1959 das Staatsexamen in Berlin.

Als Kandidat der Pharmazie war ich wiederum in der Gertruden-Apotheke tätig. Während dieser Zeit begann ich mit der vorliegenden Promotionsarbeit bei Herrn Prof. Dr. G. S c h e n c k und besuchte Vorlesungen und Übungen am Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie der Freien Universität Berlin.